

# Małopłytkowość zależna od heparyny

## Heparin-induced thrombocytopenia

Agnieszka Wróbel

Pracownia Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi, Zakład Immunologii Hematologicznej  
i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

### Streszczenie

*Heparyna jest jednym z najczęściej stosowanych leków między innymi w żylnej chorobie zakrzepowo-zatorowej. Niebezpiecznym powikłaniem leczenia heparyną jest małopłytkowość zależna od heparyny (HIT), powodowana przez przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko kompleksowi heparyny i czynnika płytkowego 4 (PF4). Praca zawiera omówienie i porównanie współczesnych metod diagnostyki HIT w oparciu o najnowsze doniesienia.*

**Słowa kluczowe:** heparyna, małopłytkowość, małopłytkowość zależna od heparyny (HIT), diagnostyka HIT

*J. Transf. Med. 2013; 6: 17–21*

### Summary

*Heparin is one of the most often used drugs in patients with thromboembolic diseases. Adverse complication of heparin treatment is heparin-induced thrombocytopenia (HIT) caused by IgG antibodies directed against heparin and platelet factor 4 (PF4) complexes. Current review bases on the recent reports and contains summary and comparison of the methods contemporarily used in HIT diagnostics.*

**Key words:** heparin, thrombocytopenia, heparin-induced thrombocytopenia (HIT), HIT diagnostics

*J. Transf. Med. 2013; 6: 17–21*

Heparyna jest mukopolisacharydem wytwarzanym naturalnie przez komórki tłuszczne wątroby, płuc, ścian naczyń krwionośnych i tkanki łącznej. Dzięki swojemu bezpośredniemu działaniu przeciwkrzepliwemu szeroko stosuje się ją w leczeniu pacjentów z chorobą zakrzepowo-zatorową, zakrzepowym zapaleniem żył, zatorami naczyniowymi i zawałami narządów oraz pacjentów z miażdżycą, odmrożeniami i oparzeniami. Handlowa heparyna otrzymywana z tkanki płucnej wołu jest mieszaniną cząsteczek o masie od 3 do nawet 30 kDa [1, 2].

Jednym z działań niepożądanych leczenia heparyną jest małopłytkowość zależna od heparyny

(HIT, *heparin-induced thrombocytopenia*), po raz pierwszy opisana w 1973 roku [3], a według definicji z roku 2000 będąca zespołem klinicznym, którego głównym objawem jest drastyczny spadek liczby płytek krwi. Potwierdzeniem obserwacji klinicznych jest wykrycie przeciwciał klasy IgG zależnych od heparyny za pomocą czulej i specyficznej metody. Przeciwciała te muszą mieć ponadto zdolność do aktywowania płytek krwi za pośrednictwem ich receptorów FcγRIIa [4, 5]. Jednym z wielu paradoksów HIT jest fakt, że mimo iż heparyna jest antykoagulantem, pacjenci są szczególnie narażeni na powstawanie zakrzepów, co bezpośrednio wiąże

**Adres do korespondencji:** mgr Agnieszka Wróbel, Pracownia Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT, ul. Chocimska 5, 00–957 Warszawa, tel./faks: 22 349 66 15, e-mail: [awrobel@ihit.waw.pl](mailto:awrobel@ihit.waw.pl)

się z aktywacją płytek i zwiększeniem ich potencjału prokoagulacyjnego [6, 7].

Małopłytkowość zależna od heparyny może przyjmować różne formy. U około 10% pacjentów leczonych heparyną obniżenie liczby płytek krwi jest nieznaczne (nigdy poniżej  $100 \times 10^9/L$ ) przy braku innych objawów klinicznych. Nie ma ono podłoża immunologicznego i obecnie nie jest traktowane jako istotna klinicznie postać małopłytkowości zależnej od heparyny, choć w przeszłości określano je nazwą HIT typu I. U 1–3% pacjentów, występuje nasilona małopłytkowość ( $< 100 \times 10^9/L$ ) powodowana przez przeciwciała skierowane przeciwko kompleksowi PF4/heparyna. Dawniej określano tę małopłytkowość nazwą HIT typu II, lecz obecnie dla tego zespołu klinicznego zarezerwowany jest termin HIT. Jeśli w przebiegu HIT typu II pojawiają się niebezpieczne dla życia pacjentów incydenty zakrzepowe i mikrozakrzepy, zespół ten definiowany jest jako małopłytkowość zależna od heparyny przebiegająca z incydentami zakrzepowymi — HIT-T (*heparin-induced thrombocytopenia and/with thrombosis*). Śmiertelność wśród pacjentów, u których wystąpiły incydenty zakrzepowe wynosi około 17–30% [2, 9].

Współczesny model HIT opiera się na założeniu, że w obecności heparyny ze spoczynkowych, nieaktywowanych płytek krwi wydzielany jest czynnik płytkowy 4 (PF4, *platelet factor 4*) — naturalny antagonist heparyny. Łączenie się PF4 z cząsteczkami leku indukuje powstanie neoepitopów antygenowych, przeciwko którym limfocyty B pacjenta zaczynają wytwarzać przeciwciała. Kompleksy immunologiczne (heparyna/PF4/przeciwciało klasy IgG) łączą się z płytkami krwi pacjenta za pośrednictwem ich receptorów Fc RIIa, co z kolei powoduje ich natychmiastową aktywację i agregację, skutkującą tworzeniem zakrzepów i maszyną małopłytkowością. Do jednoczesnego zwiększania generacji trombiny, które potęguje efekt prokoagulacyjny, przyczynia się wiązanie czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*) przez komórki śródbłonna i monocyty zaktywowane nieswoicie przez kompleksy przeciwciało/heparyna/PF4 [6, 8, 10]. Na proces tworzenia zakrzepów ma też wpływ wydzielanie przez płytki krwi mikrocząstek błonowych o wielkim potencjale prozakrzepowym [11, 12].

Krauel i wsp. zaproponowali kolejną koncepcję wyjaśniającą patomechanizm HIT. Dotyczy ona prawdopodobnego udziału bakterii w przebiegu małopłytkowości zależnej od heparyny. Autorzy sugerują, że do wystąpienia HIT bardziej predestynowani są pacjenci z niedawno przebytą

infekcją bakteryjną, która wpłynęła na swoiste „uważliwienie” ich układu immunologicznego na epitop antygenowy zawierający PF4. Według nich, w przebiegu infekcji bakteryjnej, uwalniany z płytek PF4 wiąże się z ujemnie naładowanymi oligosacharydami obecnymi na powierzchni ściany komórkowej bakterii, co powoduje zmianę jego konformacji i produkcję skierowanych do zmienionego PF4 przeciwciał, a w konsekwencji fagocytozę bakterii, z którymi związany jest zmodyfikowany czynnik płytkowy 4. W przebiegu leczenia heparyną dochodzi do podobnej zmiany struktury PF4 i powstawania przeciwciał, które wiążąc się z płytkami krwi silnie je aktywują, co prowadzi do rozwoju HIT [13].

Koncepcja Krauela pokrywa się częściowo z poglądem przedstawionym przez Rauovą i wsp., którzy także wskazują na istotną rolę PF4 w patogenezie HIT. Według tych autorów znaczenie w przebiegu HIT ma ilość PF4 zawartego w płytkach krwi. Jeśli jest go mało, w obecności heparyny dochodzi do tworzenia kompleksów leku i PF4, jednak ich ilość jest niewystarczająca do wywołania aktywacji płytek i monocytów, a w konsekwencji HIT. Odwrotnie bywa w sytuacji, gdy w płytkach pacjenta obecna jest większa ilość PF4, który naturalnie wiążąc się z glikozoaminoglikanami (GAGs, *glycosaminoglycans*) powierzchniowymi płytek indukuje nadmierne powstawanie zmodyfikowanych kompleksów PF4/GAGs, powodujących preaktywację zarówno płytek, jak i monocytów. W obecności heparyny organizm pacjenta odpowiada produkcją przeciwciał przeciwko kompleksowi leku i PF4, a wcześniej pobudzone płytki krwi są za ich pośrednictwem aktywowane, co skutkuje incydentami zakrzepowymi. Aktywowane za pośrednictwem tych samych kompleksów immunologicznych monocyty wytwarzają duże ilości czynnika tkankowego i interleukiny 8 (IL-8), co zwiększa prawdopodobieństwo zakrzepicy [14].

Według Kowalskiej i wsp. znaczenie w przebiegu HIT ma także fakt, że przeciwciała skierowane do kompleksów heparyna/PF4 hamują powstawanie aktywnego białka C (aPC, *activated protein C*), które jest naturalnym inhibitorem procesu krzepnięcia. Blokada wytwarzania aPC skutkuje incydentami zakrzepowymi [15].

Przeciwciała u pacjentów z HIT można wykryć już około 5. dnia leczenia heparyną, jeszcze przed rozpoczęciem spadku liczby płytek krwi, do którego dochodzi około 7. dnia terapii. Drastyczny, ponad 50-procentowy spadek liczby płytek pojawia się po mniej więcej 9 dniach, a pierwsze incydenty zakrzepowe występują po około 11 dniach [6].

Odpowiedź immunologiczna w HIT nie pokrywa się jednak ani z klasycznym modelem odpowiedzi pierwotnej, ani wtórnej. Zaangażowane są w nią prawdopodobnie zarówno limfocyty T, jak i B [16]. Charakterystyczna jest tu jednoczesna produkcja przeciwciał klasy IgG, jak i IgM czy IgA bądź też bardzo szybka serokonwersja przeciwciał klasy IgM w IgG, skutkująca niespotykanie wczesnym wykrywaniem przeciwciał klasy IgG. Istotny jest fakt, że tylko przeciwciała klasy IgG mają zdolność aktywowania płytek za pośrednictwem receptorów Fc RIIa [6, 17]. Według niektórych autorów przeciwciała klasy IgM i IgA także mogą brać udział w aktywacji układu dopełniacza lub monocytów i komórek śródbłonna, co może wpływać na powstawanie incydentów zakrzepowych [18]. Interesujące jest, że u chorych, którzy raz przebyli HIT, nie istnieje zwiększone ryzyko immunizacji w przypadku ponownego leczenia heparyną [7, 8, 10].

Ryzyko immunizacji kompleksem PF4/heparyna zależy głównie od typu podawanej pacjentowi heparyny (heparyna niefrakcjonowana > heparyna drobnocząsteczkowa > fondaparinux), co potwierdzają wyniki badań Leroux i wsp. [19], a także od stanu pacjenta (operacja > inne schorzenie > poród/pacjent pediatryczny), rozmiaru urazu, jakiemu uległ pacjent (duży > mały), płci pacjenta (kobieta > mężczyzna), typu operacji ortopedycznej (wymiana stawu kolanowego > biodrowego) oraz od czasu pierwszego podania heparyny (po operacji > przed operacją) [9, 12]. Według Pouplard i wsp. możliwość immunizacji kompleksem PF4/heparyna może zależeć od polimorfizmu promotora genu interleukiny 10, która odpowiada za regulację odpowiedzi immunologicznej [16].

Ciekawymi z punktu widzenia klinicznego odmianami HIT są: HIT spontaniczny, dotyczący pacjentów nieleczonych heparyną, ale przechodzących na przykład infekcje bakteryjne lub choroby autoimmunologiczne oraz HIT opóźniony, kiedy organizm zaczyna wytwarzać przeciwciała już po zakończeniu terapii heparyną [7, 24]. Według Warkentina surowice pacjentów z HIT opóźnionym mają większą zdolność do wywołania aktywacji płytek niż surowice pacjentów z typowym HIT [7].

### **Diagnostyka małopłytkowości zależnej od heparyny**

Diagnostyka HIT opiera się głównie na wykrywaniu przeciwciał skierowanych do kompleksu heparyna/PF4 albo do samego PF4. Do tego celu stosowane są zarówno metody enzymatyczne (np.

PF4 Enhanced<sup>®</sup> firmy GTI czy też Asserachrom<sup>®</sup> HPIA [*heparin platelet factor 4-induced antibody*, firmy Stago], jak i metody immunofiltracji [FLIFA, *fluorescence-linked immunofiltration assay*], i ELIFA, *enzyme-linked immunofiltration assay*) oraz aglutynacji żelowej (ID-PF4/*heparin antibody test* firmy Diamed) [10]. Niedawno do diagnostyki HIT wprowadzono nową metodę wykrywania przeciwciał zależnych od heparyny — ELISA Zymutest HIA IgG/A/M<sup>®</sup> i Zymutest HIA IgG<sup>®</sup>. Od pozostałych metod enzymatycznych odróżnia ją moment dodania PF4 do mieszaniny reakcyjnej. Dzieje się to nie na samym początku, a dopiero przy dodawaniu lizatu płytek krwi i osocza badanego pacjenta. Dzięki temu metodą tą można wykryć nie tylko przeciwciała heparynozależne związane na powierzchni płytek, ale też krążące oraz przeciwciała skierowane do innych kompleksów immunologicznych, w których skład wchodzi heparyna [20]. Obecnie w opracowaniu są także metody chemiluminescencji, które w przyszłości być może także będą wykorzystywane do wykrywania przeciwciał zależnych od heparyny [21].

Niezwykle istotną grupą metod w diagnostyce HIT są metody czynnościowe, związane z pomiarem aktywności płytek krwi i ich zdolności do agregacji, powodowanej przez przeciwciała pojawiające się na skutek leczenia heparyną. „Złotym standardem” wśród metod czynnościowych jest metoda mierząca uwalnianie serotoniny przez płytki zaktywowane przeciwciałami obecnymi w surowicy pacjenta (<sup>14</sup>C-SRA, *serotonin release assay*). Istnieje też niezależna od radioaktywnych izotopów metoda pomiaru wywoływanej przez heparynę aktywacji płytek (HIPA, *heparin induced platelet activation*). Jednym z jej wariantów jest wchodząca ostatnio na rynek metoda cytometrycznego pomiaru aktywacji płytek w obecności heparyny (testy HITAlert<sup>®</sup> firmy IQ Diagnostics) [10].

Nowością w diagnostyce HIT jest oznaczanie stężeń mikrocząstek uwalnianych z powierzchni błon komórkowych zaktywowanych płytek (PMPs, *platelet microparticles*) [11, 12].

Najczęściej w diagnostyce HIT używa się metod enzymatycznych. Ich wykonanie jest nieskomplikowane, są ponadto niedrogie i nie wymagają specjalistycznego wyposażenia. Stosowanie metod enzymatycznych może jednak powodować zbyt częste diagnozowanie HIT u pacjentów, u których wykryto przeciwciała skierowane do kompleksu PF4/heparyna lub samego PF4. Autorzy od lat zajmujący się tematyką HIT zwracają uwagę, że dla prawidłowej diagnozy ważne jest nie tylko samo wykrycie u pacjenta przeciwciał, ale stwierdzenie, czy mają

one zdolność do aktywowania płytek krwi, co w konsekwencji wpływa na powstawanie incydentów zakrzepowych u chorych. Możliwość taką daje badanie aktywacji płytek. Niestety, jakkolwiek ocena aktywacji płytek poprzez pomiar uwalniania serotoniny wydaje się „złotym standardem” i w najlepszy możliwy sposób pozwala potwierdzić podejrzenie HIT u pacjenta, jest to metoda żmudna w wykonaniu, wymaga doświadczenia oraz wyposażenia, umożliwiającego przeprowadzanie testów z użyciem odczynników znakowanych radioaktywnymi izotopami [7, 10]. Badanie stężenia mikrocząstek płytkowych również wymaga wciąż dopracowania i standaryzacji, jednak nawet dotychczas uzyskiwane za pomocą tej metody wyniki dowodzą, że umożliwia ona ocenę zagrożenia pacjenta incydentami zakrzepowymi [11]. Najlepsze i najbardziej miarodajne z perspektywy klinicysty byłoby połączenie obu metod — enzymatycznych i czynnościowych [7, 10]. Przeciwciała do kompleksu PF4/heparyna lub samego PF4 wykrywane są bowiem u 15–25% pacjentów poddawanych operacjom ortopedycznym leczonych heparyną niefrakcjonowaną i u około 6–15% leczonych heparynami drobnocząsteczkowymi. Wśród pacjentów poddawanych operacjom kardiologicznym leczonych heparyną niefrakcjonowaną częstość występowania przeciwciał wynosi nawet 50–70%. Dodatkowe potwierdzenie diagnozy za pomocą metod czynnościowych zawęża jednak krąg pacjentów z „prawdziwym”, zagrażającym życiu HIT do około 10–12% chorych [7].

Mimo zastosowania opisanych metod, zarówno enzymatycznych, jak i czynnościowych, wciąż wielkie znaczenie w rozpoznaniu małopłytkowości zależnej od heparyny ma obraz kliniczny. W Polsce należy pamiętać o tym szczególnie, jako że niedostępne są u nas jeszcze czynnościowe metody pomiaru aktywacji płytek krwi za pośrednictwem przeciwciał, uznawane w diagnostyce HIT za metodę referencyjną.

### **Leczenie małopłytkowości zależnej od heparyny**

Leczenie HIT polega na natychmiastowym odstawieniu heparyny i zastosowaniu innego antykoagulantu. W praktyce, jedynym dostępnym w Polsce antykoagulantem zastępczym jest fondaparinux — syntetyczny pentasacharyd, wybiórczo hamujący aktywny czynnik X. Wyniki badań klinicznych wykazują, że ma on podobną skuteczność antykoagulacyjną jak heparyna drobnocząsteczkowa. W przeciwieństwie do heparyny jednak, specyfika budowy molekularnej fondaparinuxu uniemożli-

wia monitorowanie leczenia [25]. W przypadkach HIT należy także pamiętać o unikaniu stosowania heparyny przy płukaniu cewników, które mają podłączone pacjenci [9, 10, 22]. Zdania na temat zasadności i bezpieczeństwa toczeń koncentratów płytkowych u pacjentów z HIT są podzielone [23]. Strategia leczenia zależy jednak od stanu pacjenta. Wykrycie przeciwciał bez klinicznych objawów małopłytkowości i zakrzepicy nie wymaga podjęcia opisanych kroków [10].

W świetle przedstawionych informacji ważne okazuje się prawidłowe monitorowanie terapii heparyną u hospitalizowanych pacjentów, zwłaszcza poddawanych operacjom ortopedycznym i kardiologicznym. Ważne jest też wczesne wykrycie powodujących małopłytkowość i aktywację płytek przeciwciał klasy IgG odpowiednimi i uzupełniającymi się wzajemnie metodami, a także odpowiednia ocena stanu klinicznego pacjenta.

### **Piśmiennictwo**

1. Danysz A. Kompendium farmakologii i farmakoterapii. Urban & Partner, wyd. IV, Wrocław 2007.
2. Bomski H. Podstawowe laboratoryjne badania hematologiczne. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, wyd. III popr., Warszawa 1995.
3. Rhodes G.R., Dixon R.H., Silver D. Heparin induced thrombocytopenia with thrombotic and hemorrhagic manifestations. Surg. Gynecol. Obstet. 1973; 136 (3): 409–416.
4. Kelton J.G., Sheridan D., Santos A. i wsp. Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. Blood 1988; 72: 925–930.
5. Chong B.H., Fawaz I., Chestermann C.N., Berndt M.C. Heparin-induced thrombocytopenia: mechanisms of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets. Br. J. Haematol. 1989; 73 (2): 235–234.
6. Warkentin T.E., Sheppard J.I., Moore J.C., Cook R.J., Kelton J.G. Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia. Blood 2009; 113: 4963–4969.
7. Warkentin T.E. HIT paradigms and paradoxes. J. Thromb. Haemost. 2011; 9 (supl. 1): 105–117.
8. Greinacher A., Lubenow N. Heparin induced thrombocytopenia. Orphanet Encyclopedia, 2003; <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-HIT.pdf>
9. Jang I.K., Hursting M.J. When heparins promote thrombosis. Review of heparin-induced thrombocytopenia. Circulation 2005; 111: 2671–2683.
10. Leo A., Winteroll S. Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia and monitoring of alternative anticoagulants. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2003; 10 (5): 731–740.
11. Warkentin T.E., Hayward C.P.M., Boshkov L.K. i wsp. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. Blood 1994; 84 (11): 3691–3699.
12. Hughes M., Hayward C.P.M., Warkentin T.E. i wsp. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. Blood 2000; 96 (1): 188–194.



13. Krauel K., Potschke C., Weber C. i wsp. Platelet factor 4 binds to bacteria-inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia *Blood* 2011; 117 (4): 1370–1378.
14. Rauova L., Arepally G., McKenzie S.E., Konkle B.A., Cines D.B., Poncz M. Platelet and monocyte antigenic complexes in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7 (1): 249–252.
15. Kowalska M.A., Krishnaswamy S., Rauova L. i wsp. Antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia (HIT) inhibit activated protein C generation: new insights into the prothrombotic nature of HIT. *Blood* 2011; 118 (10): 2882–2888.
16. Pouplard C., Cornillet-Lefebvre P., Attaoua R. i wsp. Interleukin-10 promoter microsatellite polymorphisms influence the immune response to heparin and the risk of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb. Res.* 2012; 129 (4): 465–469.
17. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7 (1): 9–12.
18. Alberio L. Heparin-induced thrombocytopenia: some working hypotheses on pathogenesis, diagnostic strategies and treatment. *Curr. Opin. Hematol.* 2008; 15 (5): 456–464.
19. Leroux D., Canepa S., Viskov C. i wsp. Binding of heparin-dependent antibodies to PF4 modified by enoxaparin oligosaccharides: evaluation by surface plasmon resonance and serotonin release assay. *J. Thromb. Haemost.* 2012; 10 (3): 430–436.
20. Pouplard C., Leroux D., Regina S., Rollin J., Gruel Y. Effectiveness of a new immune-assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia and improved specificity when detecting IgG antibodies. *Thromb. Haemost.* 2010; 103: 145–150.
21. Legnani C., Cini M., Pili C., Boggian O., Frascaro M., Palareti G. Evaluation of a new automated panel of assays for the detection of anti-PF4/heparin antibodies in patients suspected of having heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb. Haemost.* 2010; 104 (2): 402–409.
22. Hook K.M., Abrams C.S. Treatment options in heparin-induced thrombocytopenia. *Curr. Opin. Hematol.* 2010; 17: 424–431.
23. Refaai M.A., Chuang C., Menegus M., Blumberg N., Francis C. Outcomes after platelet transfusion in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8: 1419–1421.
24. Pazner R., Greinacher A., Selleng K. i wsp. False-positive tests for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7: 1070–1074.
25. Crowther M., Lim W. Fondaparinux — evolution or revolution in anticoagulant care? *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2007; 117 (3): 5–6.